

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



Leona Zieglerová

Autofagie jako mechanismus adaptace kvasinek

Autophagy as a mechanism of adaptation the yeast

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Libuše Váchová, Csc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2013

Leona Zieglerová

Děkuji RNDr. Libuši Váchové, Csc. za cenné rady a připomínky při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při psaní závěrečné práce i samotném studiu.

Abstrakt

Autofagie je degradační cesta, zachovalá od kvasinek až po savce. Výjimečnost této cesty tkví v její funkci, uplatňuje se v buňce především za nepříznivých podmínek. Pomáhá buňce obstarávat esenciální živiny pro život, odstraňuje poškozené nebo nadbytečné organely, agregáty proteinů a pomáhá s jejich recyklací a udržuje stálé vnitřní prostředí. Těmito funkcemi může buňce prodloužit život a ta přečká nepříznivé podmínky. Autofagie může vyvolávat i buněčnou programovanou smrt typu II. Tato práce se zabývá popisem základního autofagního procesu, regulací a vlivem autofagie na adaptaci kvasinek k stresovým podmínkám. Také představuje jednotlivé druhy specifické autofagie. Pochopení mechanismu a regulace autofagie u kvasinek může pomoci se studiem autofagie u savců. U nichž poruchy této degradační cesty způsobují řadu onemocnění (především neurodegenerativních), autofagie také ovlivňuje vznik nádorů.

Klíčová slova: autofagie, stresové podmínky, kvasinky, degradace, programovaná buněčná smrt

Abstract

Autophagy is a degradation pathway, conserved from yeast to mammals. The uniqueness of this pathway lies in its function, it is applied in the cell especially under the adverse conditions. It helps the cell to deliver essential nutrients for life, it removes the damaged or superfluous organelles, protein aggregates and helps with recycling and maintains a constant inner environment. These functions can prolong cell life and the cells survive the adverse conditions. Autophagy may induce the programmed cell death type II. This paper describes the basic of autophagy machinery, regulation and influence of yeast autophagy to adapt to the stressful conditions. Understanding the mechanism and regulation of autophagy in yeast may help with the study of autophagy in mammals. In mammals, this degradation pathway disorders cause many diseases (especially neurodegenerative), autophagy also effects the formation of tumors.

Key words: autophagy, stress conditions, yeast, degradation, programmed cell death

Seznam zkratek

AB	autophagic body	autofagní tělísko
ABDs	alpha mannosidase- binding domains	alfa manosidázové vazebné domény
AIM	Atg8 family interacting motif	interakční motiv rodiny Atg8
AK	amino acids	aminokyseliny
Ape1	aminopeptidase 1	aminopeptidáza 1
ATG	autophagy-related genes	s autofagií související geny
Cvt pathway	cytoplasm-to-vacuole pathway	z cytoplasmy do vakuoly cílená dráha
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmic reticulum	endoplasmatické retikulum
ERA	ER- contain in autophagosomes	autofagosom obsahující ER
LN	late nucleophagy	pozdní nukleofagie
MAC	Mitochondrial apoptosis-induced channel	Mitochondriální apoptózou indukovaný kanál
MIPA	the micropexophagy apparatus	mikropexofagní aparát
MVB	multivesicular body	mnoha váčkovité tělísko
NNS	non-nitrogen-starvation	bez nedostatku dusíku
PAS	preautophagosomal structure	peautofagosomální struktura
PE	phosphatidylethanolamine	fosfatidyletanolamin
PI3K	phosphatidylinositol 3-OH kinase	fosfatidylinositol 3-OH kináza
PI3/4P	phosphatidylinositol 3/4-phosphate	fosfatidylinositol 3/4-fosfát
PMN	piecemeal microautophagy of the nucleus	částečná mikroautofagie jádra
Ppg	the pexophagosome	pexofagosom
PrA/B	proteinase A/B	proteináza A/B
prApe1	precursor of aminopeptidase 1	prekurzor aminopeptidázy 1
ROS	reactive oxygen species	volné kyslíkové radikály
SKL signál	serin-lysin-leucin signal	serin-lysin-leucinový signál
TOR	target of rapamycin	cíl rapamycinu
TORC1/2	target of rapamycin complex 1/2	komplex cíle rapamycinu 1/2
Ubl proteiny	ubiquitin like proteins	ubiquitinu podobné proteiny
VPS	vacuolar protein sorting	vakuolární balení proteinů

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Autofagie.....	2
2.1	Core autofagního procesu	2
2.1.1	Atg9 a jeho cyklický systém.....	2
2.1.2	PI3K komplex	2
2.1.3	Ubl komplex.....	3
3	Druhy autofagie.....	1
3.1	Nespecifická makroautofagie	1
3.1.1	Pre-autofagosomální struktury (PAS)	1
3.1.2	Autofagosom	3
3.1.3	Autofág ní tělí ska (AB's).....	4
3.2	Specifická autofagie	4
3.2.1	Cvt (cytoplasm-to-vacuole targeting) dráha	5
3.2.2	Pexofagie	7
3.2.3	Mitofagie	9
3.2.4	Retikulofagie.....	10
3.2.5	Nukleofagie	11
4	Funkce autofagie	13
4.1	Regulace autofagie.....	13
4.1.1	TOR (the target of rapamycin) signalizační dráha	13
4.1.2	Regulace přes Atg1 komplex	15
4.2	Adaptace k prostředí.....	16
4.2.1	Programovaná buněčná smrt typu II	17
5	Závěr	19
6	Seznam použité literatury.....	20

1 Úvod

Jednou z nejzákladnějších dovedností buněk je získávání živin potřebných pro život. Zdrojem živin pro buňku je nejen prostředí, ve kterém se vyskytuje, ale i její vlastní zásoby uvnitř buňky. Tyto zásoby mohou mít různou podobu (organely, proteiny, membrány,...), z nich lze degradací získat základní stavební složky. Ty jsou využity pro biosyntézu pro život nezbytných makromolekul. Tuto recyklaci provádějí buňky i v období, kdy je v okolí dostatek zdrojů živin, jelikož je pro ně výhodná. Endosomální transportní cesta většinou dopravuje soubory specifických proteinů plasmatické membrány. Tyto proteiny jsou označeny ubiquitinem a degradovány přes MVB cestu. Vakuolární importní a degradační cesta degraduje pouze konkrétní molekuly. V době strádání musely buňky vyvinout cestu, která by umožňovala rychlejší a efektivnější recyklaci z větší škály zdrojů tzv. autofagii. Na rozdíl od endosomální transportní cesty či vakuolární importní a degradační cesty umí rychle degradovat nadbytečné nebo poškozené organely ve vakuole a poskytnout dále z nich získané stavební molekuly.

Autofagie má mnoho podob, může být nespecifická i specifická. Může probíhat v cytoplazmě (makroautofagie) nebo na povrchu vakuoly (mikroautofagie). Všechny typy, ale mají společné core autofagního procesu cca 17 Atg proteinů. Další proteiny dávají specifčnost určitému typu autofagie. Předmětem této bakalářské práce je popis autofagního procesu u nespecifické makroautofagie a představení druhů specifické autofagie, ucelení poznatků o složité síti autofagní regulace, zohlednění funkce autofagie při adaptaci k různým výživovým či jiným stresovým podmínkám, jenž mohou vést až k vyvolání programované buněčné smrti.

2 Autofagie

Autofagie je degradační proces zodpovědný především za rozpad proteinů s dlouhou životností a celých organel, což jiná degradační cesta neumí. Jedná se o cestu, která může dopravovat do vakuoly nadbytečné nebo poškozené ribosomy, hrubé ER, mitochondrie a další intracelulární struktury jako jsou lipidová granula, granula glykogenu, a membránové váčky. Někdy může přinášet vybrané organely nebo pouze cytoplazmu s proteiny (Takeshige et al, 1992). Důležitou úlohu hraje závěrečný krok, a to především za podmínek nedostatku živin, kterým je recyklace makromolekul, které byly autofagií dopraveny do vakuoly/lysosomu k nové redistribuci v buňce. Další významnou funkcí je udržování stálého vnitřního prostředí uvnitř buňky (Yang et al, 2006).

Existuje mnoho podob autofagie (viz. obr. 1), základní rozdělení souvisí s nákladem, který je autofagií dopravován. Náklad může být vybrán náhodně, jedná se o nespecifickou autofagii nebo se jedná o cílený výběr nákladu - specifickou autofagii. U nespecifické autofagie je náklad vybrán náhodně a spolu s větším množstvím cytoplazmy je oddělen autofagosomem. Během specifické autofagie je vybraný náklad zabalen do váček s dvojitou membránou. Obsahují málo cytoplazmy a jejich tvar kopíruje náklad. Všechny typy autofagie používají konzervované „core“ (základ) autofagního procesu., které je zásadní pro tvorbu oddělujících váček. Je složen ze tří hlavních funkčních skupin: Atg9 a jeho cyklický systém, fosfatidylinositol 3-OH kinázový (PI3K) komplex, ubiquitin podobný proteinový (Ubl) systém. Mnoho *ATG* genů se účastní autofagního procesu u selektivní i neselektivní autofagie. Názvosloví genů spojených s autofagií u kvasinek bylo sjednoceno do jednotné kvasinkové nomenklatury Klionskym et al, 2003 (Xie & Klionsky, 2007, review; Klionsky et al, 2003).

2.1 Core autofagního procesu

2.1.1 Atg9 a jeho cyklický systém

Zahrnuje Atg9, Atg1 kinázový komplex (Atg1 a Atg13), komplex Atg2 s Atg18 (Xie & Klionsky, 2007, review). Atg1 kinázový komplex se skládá z Atg1, Atg13, a subkomplexu Atg17-Atg31-Atg29.

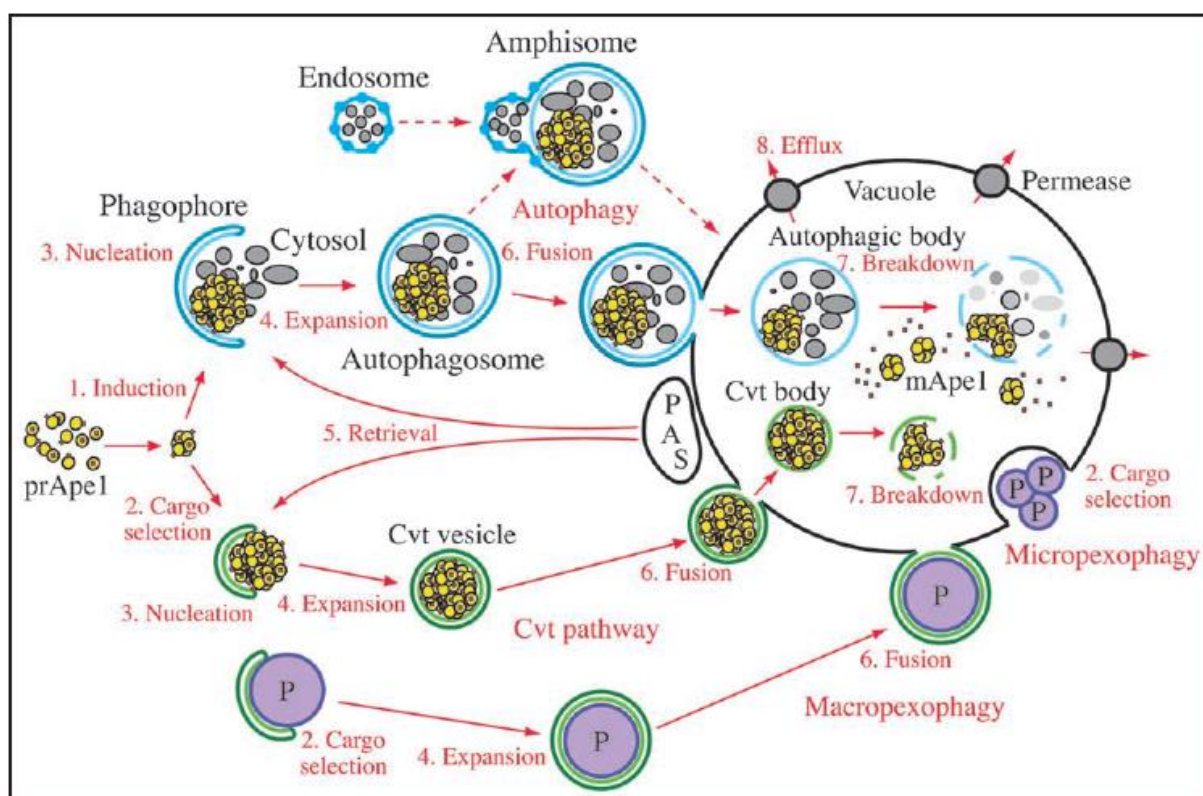
2.1.2 PI3K komplex

Syntéza fosfatidylinositol 3 fosfátu (PI3P) a jeho enzymu Vps34 je velice důležitá u všech organismů pro autofagii. PI3P se účastní časně fáze tvorby autofagosomu. Regulačním proteinem pro Vps34 je Vps15. V kvasince existují dva komplexy, komplex I obsahuje Vps34

Vps15, Vps30 (Atg6) a Atg14. Komplex II obsahuje Vps34, Vps15, Vps30 a Vps38. Komplex I je zásadní pro autofagii, komplex II je esenciální pro endosomální VPS dráhu. Vazebnými proteiny pro PI3P jsou Atg18, Atg21 (Kihara et al, 2001). Vazba PI3P k Atg18 je důležitá pro spojení Atg18-Atg2 na PAS. Vyskytuje se i několik dalších proteinů, kteří váží PI3P v selektivních typech autofagie. Vps34 a její lipidový produkt PI3P mohou ovlivňovat TOR signální dráhu, zjištěním množství aminokyselin v buňce (Burman & Ktistakis, 2010, review).

2.1.3 Ubl komplex

Zahrnuje Atg8 a Atg12, aktivací enzym Atg7, Atg10 a Atg3 (analogy ubiquitinových konjugací enzymů), Atg4 (modifikační proteáza Atg8) a Atg5 (Xie & Klionsky, 2007, review).



Obrázek 1: Schématický přehled typů autofagických procesů. Nespecifická autofagie zahrnuje sedm kroků: 1) indukci 3) tvorbu nukleárního vakuoly, 4) dokončení vakuoly, 5) získávání stavebních složek z PAS, 6) fúzi vakuoly s vakuolou, 7) rozpad vakuoly, 8) výtok rozloženého materiálu do cytoplazmy. Specifické druhy autofagie zahrnují navíc další krok 2) rozpoznání nákladu a jeho balení. Znárodně je nespecifická autofagie a dva příklady specifické - dráha cílená z cytoplazmy do vakuoly a pexofagie (Klionsky et al; 2007, review).

3 Druhy autofagie

3.1 Nespecifická makroautofagie

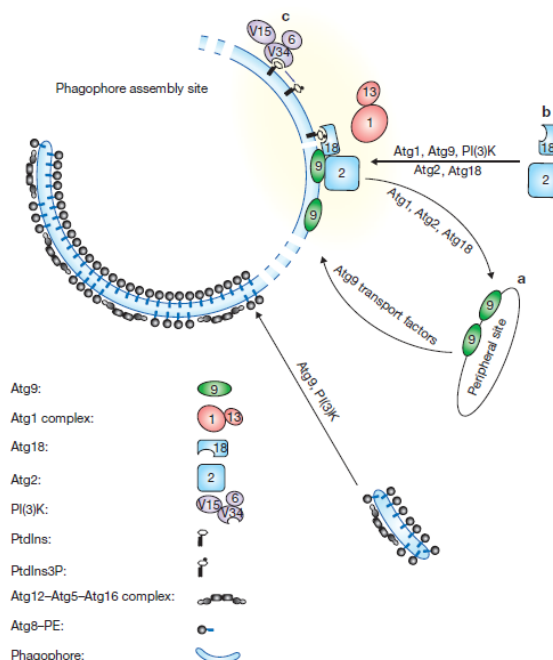
Během makroautofagie je oddělena cytoplasma s proteinovými agregáty či organelami do struktury s dvojitou membránou, autofagosomu, který následně fúzuje s vnější membránou vakuoly. Zaniká tím jedna vrstva membrány a vzniká nová jednovrstevná struktura vázaná k vakuolární membráně, autofagní tělísko (AB). Tento proces je indukován nedostatkem živin v prostředí a zajišťují ho *ATG* geny a jejich produkty. Do dnešní doby je známo přes třicet *ATG* genů. Proteiny těchto genů se rozdělují do pěti funkčních skupin: Atg1 proteinová kináza a její komplex, dva ubiquitinu podobné systémy, komplex Atg2·Atg18 a PI3K komplex (Suzuki et al, 2001). Autofagní proces, u nespecifické autofagie, se skládá ze sedmi kroků viz obr. 1. Prvním je indukce autofagie aktivací Atg1 komplexu, která spočívá nejspíše v ukončení fosforylace Atg13 TORC1 (viz kapitola Regulace přes Atg1 komplex). Druhý spočívá v tvorbě nukleačního váčku, který začíná shromažďováním Atg proteinů na určitém místě (v PAS). Poté dochází k dokončení nukleačního váčku s dvojitou membránou pomocí Ubl konjugčních systémů, jež nazýváme autofagosom a obsahuje cytoplasmu s nákladem. Všechny složky PAS nejsou zahrnuty v autofagosomu, ale některé jsou zpětně transportovány do periferních částí k novému použití např. Atg9. Posledním krokem je spojení váčku s vakuolou a degradace materiálu, jehož složky jsou redistribuovány (viz níže podrobněji).

3.1.1 Pre-autofagosomální struktury (PAS)

Pre-autofagosomální struktury jsou organizační centra pro vznik autofagosomů umístěné v perivakuolárním prostoru. Poprvé byly identifikovány v roce 2001 (Suzuki et al, 2001; Suzuki et al, 2007). PAS je dynamická struktura, ve které se neustále shromažďují a rozpadají Atg proteiny (Kawamata et al, 2008). Atg17 slouží pro ostatní proteiny jako lešení, k němuž se připojují další Atg proteiny či se umísťují poblíž. Atg17 je potřebný i v jiných spojeních s dalšími membránovými výměnnými cestami autofagního procesu. K přijímání dalších Atg proteinů pomocí Atg17 je potřebný signál nedostatku živin. Z toho vyplývá, že na základě citlivosti buněk k množství živin v prostředí se kontroluje tvorba PAS. Při růstových podmínkách totiž Atg proteiny přijímá Atg11 pro tvorbu Cvt váčků (Suzuki et al, 2007).

Existuje hierarchie přijímání Atg proteinů k organizaci PAS. Nejvýše stojí již zmíněný Atg17, který je vyžadován pro umístění Atg13 na PAS (Suzuki et al, 2007). Atg17 tvoří komplex s Atg29 a s Atg31, toto spojení je nepostradatelné pro přijímání dalších Atg proteinů do PAS a k tvorbě autofagosomů (Kawamata et al, 2008). Atg13 je nutný pro lokalizaci Atg1 (Suzuki et al, 2007). Tvoří spolu komplex, jehož vznik řídí negativně Tor signalizace přes fosforylační místo na Atg13 a je taktéž potřebný pro přijímání dalších Atg proteinů do PAS (Kawamata et al, 2008). Přítomnost Atg1 proteinové kinázy a jejích regulátorů (Atg1, Atg13, Atg17) společně s proteinem Atg9 a PI3K komplexem I způsobuje cílení komplexu Atg2·Atg18 na PAS (Suzuki et al, 2007). Členové PI3K komplexu I, jsou požadovány pro přijímání Atg8-PE a komplexu Atg12-Atg5·Atg16 do PAS. Umístění Atg5 na PAS je závislé na přítomnosti Atg16. Toto spojení slouží jako signál pro vznik komplexu Atg12-Atg5·Atg16. Pro lokalizaci Atg8 do PAS je nutný vznik Atg8-PE (Suzuki et al, 2007). Včlenění Atg9 do PAS je bezpodmínečně

nutný děj pro autofagii. Jeho včlenění je závislé na proteinech Atg17 a Atg1, a dochází k němu za podmínek indukujících autofagii. Unikátní struktura, kde se nachází Atg9, byla nazvána jako periferní kompartment Atg9 (Atg9-PC). Doprava Atg9 požaduje Atg2 a Atg11 (Chang et al, 2005). Lokalizace Atg2 na PAS ovlivňuje rovnováhu sbalení a rozložení Atg9 na PAS. Kinázová aktivita Atg1 řídí dynamiku přijímání Atg9 do PAS zprostředkovanou přijímáním Atg2 do PAS. Atg9 přímo interaguje s Atg17 pomocí N-terminální oblasti (Sekito et al, 2009). Atg9 a Atg23 nejsou s ostatními Atg proteiny na PAS degradovány, ale jsou zpětně transportovány. Cyklus probíhá přes PAS (viz. obr. 2) a je regulován komplexem Atg1-Atg13, přičemž je vyžadována přítomnost Atg2, Atg18 a PI3K komplexu I. Zpětný transport Atg9 z PAS je tvořen nezávisle na Atg1 kinázové



Obrázek 2: Cyklizace Atg9 v PAS.

A) Doprava Atg9 do PAS vyžaduje pomocné faktory Atg23 a Atg27, pro retrográdní transport jsou potřebné komplex Atg1, Atg18 a Atg2.

B) PAS umístění Atg2 a Atg18 váže PtdIns(3)P

C) PI(3)K komplex včetně lipidové kinázy Vps34 (V34), regulační enzym Vps15 (V15) a Atg6 (Xie & Klionsky, 2007, review).

aktivitě (Reggiori et al, 2004). Tato skutečnost je v rozporu s pozorováním Sekito et al. 2009, který uvádí, že kinázová aktivita Atg1 reguluje rovnováhu sbalení či roztržení Atg9 na PAS (Sekito et al, 2009). Kinázová aktivita Atg1 je také vyžadována pro správnou redistribuci Atg23 v bohatém médiu (Reggiori et al, 2004).

3.1.2 Autofagosom

Autofagosom je struktura podobná váčku, obalená dvěma membránami, obsahuje cytoplazmu a někdy i celé organely. Právě tyto váčky přinášejí buněčný obsah k degradaci do vakuoly v nepříznivém období. Autofagosomy nejsou rovnoměrně rozmístěné po celé cytoplazmě, ale preferují určitá místa (Baba et al, 1994). Právě oblast výskytu autofagosomů předurčují pre-autofagosomální struktury. Za vznikem stojí tzv. izolační membrána, která se rozšiřuje do váčků s dvojitou membránou. Expanzi podporuje Atg8 (Ubl protein) spojený s fosfatidyletanolaminem (PE), který je kotvený na izolační membráně. Část Atg8-PE je zabalena do autofagosomu, kde umožňuje inkorporaci nákladu do autofagosomu pro degradaci (Kirisako et al, 1999; Ichimura et al, 2000). Do tvorby autofagosomu je zapleten i Atg1. Atg1 obsahuje AIM (interakční motiv Atg8 rodiny), kterým se váže k Atg8, tudíž napomáhá rozšíření izolační membrány do autofagosomu (Nakatogawa et al, 2012).

Autofagosom plný materiálu určenému k degradaci splývá s vakuolou. K jeho dopravení k vakuole pomáhají dva proteiny Atg4 a Atg8 napojené na mikrotubuly. Mezi Atg4 a Atg8, Atg4 a Tub1 a Atg8 a Tub2 byly zjištěny silné interakce, čímž vzniká komplex Atg4-Atg8. Skutečnost, že tyto proteiny jsou důležité pro dopravu autofagosomů do vakuoly, vychází z výsledků získaných na kmenech kvasinek mutovaných v genech *ATG4* a *ATG8*. Tyto kmeny nebyly schopny hromadit AB's ve vakuole v období nedostatku živin, vykazovaly výrazný pokles degradace proteinů, nižší životnost mutant, blokaci sporulace u diploidních mutantních kmenů, blokaci vychytávání pre-aminopeptidasy I a její maturace vakuolou, a to i přesto, že lze u těchto mutantních kmenů pozorovat výskyt autofagosomů v cytosolu (Lang et al, 1998). Kirisako et. al, poukazují, že pro autofagii nejsou mikrotubuly potřebné (Kirisako et al, 1999). Tento jev potvrzují i Reggiori et al, kteří dále uvádějí, že pro nespecifickou autofagii není potřebný funkční aktinový cytoskelet. Pro specifický typ autofagie, jako jsou Cvt dráha a pexofagie, je pro správný vývoj těchto procesů funkční aktinový cytoskelet nezbytný (Reggiori et al, 2005). Jako multispecifický receptor (t-SNARE), který ukotvuje nebo spojuje více transportních intermediátů na/k vakuolu/-e, slouží vakuolární membránový protein Vam3, homolog syntaxinu. Vam3 je požadován i pro fúzi

autofagosomu s vakuolou. Protein funguje ve spojení s dalším proteinem Vps33 (Darsow et al, 1997; Wada et al, 1997).

3.1.3 Autofágní tělíska (AB's)

Autofágní tělíska vznikají po fúzi vnější membrány autofagosomu s vakuolou, kdy se odhalí vnitřní membrána, která chrání ve vakuole svůj obsah, do doby než se dostane do lumen vakuoly. AB's byla identifikována dříve než autofagosomy, díky tomu, že za nepříznivých podmínek bylo pozorováno jejich hromadění ve vakuole. Protože obsahovaly cytosol, který AB's oddělovaly od prostoru vakuoly, bylo zřejmé, že tato tělíska jsou komponentou procesu autofagie. AB's jsou posléze se svým obsahem degradována ve vakuole prostřednictvím proteolytických enzymů. U kmenů s mutací v proteináze B (PrB) a proteináze (PrA), dochází k jejich hromadění právě v lumen vakuoly (Takeshige et al, 1992; Thumm et al, 1994). Ke správnému rozpadu AB's je potřebná funkční H^+ - ATPáza na vakuole, která vytváří uvnitř vakuoly kyselé prostředí (Nakamura et al, 1997). Proces degradace membrán je v buňce přísně kontrolován a řízen, proto i k rozpadu AB's jsou zapotřebí další proteiny Atg22 (Aut4), Atg15 (Aut5/Cvt17) (Suriapranata et al, 2000; Epple et al, 2001; Teter et al, 2001).

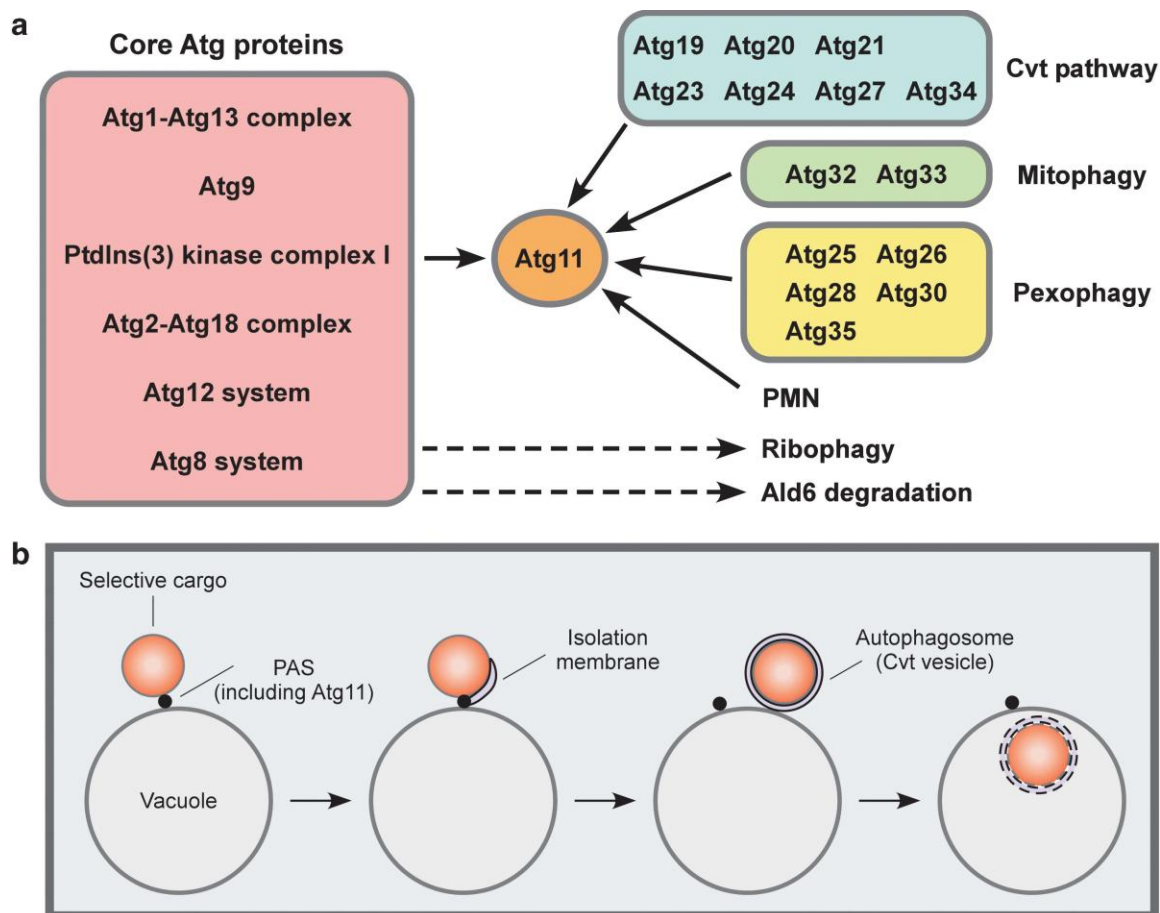
Cvt 17 je protein odpovědný za degradaci Cvt váčků ve vakuole v Cvt dráze, patří mezi membránové integrační proteiny typu II (Teter et al, 2001). Protein Atg 15 je nejspíše lipáza, která přímo způsobí lýzi autofágických tělísek uvnitř vakuoly. Je dopravována pomocí MVB (mnoha-váčekovitě tělísko) váčků, které mohou fúzovat s vnitřní membránovou vrstvou autofagosomu, tím se Atg15 objeví na AB's. Aby nedocházelo k nekontrolovatelné buněčné smrti důsledkem nespecifické hydrolýzy membrán, musí mít tento enzym substrátovou specifitu (Epple et al, 2001 a 2003).

Úloha proteinu Atg22 v rozpadu AB's byla přehodnocena autory Yang et al. Dle jejich výsledků se tento protein Atg22 podílí až na posledním kroku autofagie, jenž spočívá ve výlevu aminokyselin z vakuoly. Je součástí membrány vakuoly, kde prokazatelně funguje jako přenašeč pro tyrosin, leucin, isoleucin. Tyto aminokyseliny se přenášejí i pomocí dalších proteinů Avt3 a Avt4. Určitá koncentrace aminokyselin v cytoplazmě je důležitá k udržení životaschopnosti v období nedostatku živin, tudíž musí být přísně hlídána (Yang et al, 2006; Suriapranata et al, 2000).

3.2 Specifická autofagie

Rozlišují se dvě kategorie specifické autofagie, vysoce selektivní (závislé na Atg11) nebo méně selektivní (nevyžadují Atg11) viz obr. 3. Mezi vysoce selektivní řadíme Cvt

dráhu, mitofagii, pexofagii a nukleofagii. Protein Atg11 funguje jako nákladový receptor, který spojuje vybrané orgány či molekuly s proteiny z core autofagního procesu za vzniku autofagosomu (Suzuki, 2013, review).



Obrázek 3 a) Přehled specifických typů autofagie a jejich hlavních komponent. b) Schématické znázornění selektivní autofagie závislé na Atg11: rozpoznání nákladu, tvorba izolační membrány okolo nákladu, fúze a následně degradace vybraného nákladu (Suzuki, 2013, review).

3.2.1 Cvt (cytoplasm-to-vacuole targeting) dráha

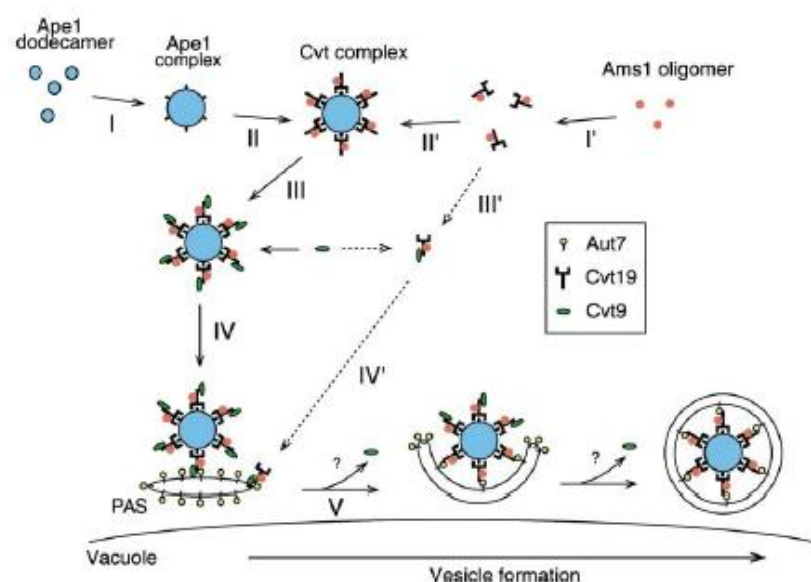
Cvt dráha je selektivní typ autofagie. Jedná se o biosyntetickou dráhu, která je za vegetativních podmínek zodpovědná za dopravu nově syntetizovaných proteinů, a to prekurzorů aminopeptidázy (prApe1) a α -manosidázy (Ams1), do vakuoly, tedy místa jejich působení. Za podmínek nedostatku živin jsou tyto proteiny dopravovány do vakuoly pomocí nespecifické makroautofagie (Baba et al, 1997; Watanabe et al, 2010; Scott et al, 1996). Cvt dráha sdílí s makroautofagií podobné fenotypické charakteristiky i některé základní komponenty. prApe1 se může někdy vázat přímo na povrch membrány vakuol a může spouštět proces, který zahrnuje invaginaci membrány a následující odstříhnutí vzniklého váčku. Tento proces je podobný endocytóze (Harding et al, 1996). Předpokládá se, že prekurzor Ape1 je transportován uvnitř váčku s dvojitou membránou (cvt váček). Tento váček

se tvoří v cytosolu, má tedy mnoho podobností s degradativním makroautofagickým autofagosomem. Cvt váčky mají velikost 140-160 nm, jsou tedy menší než autofagosomy, jejichž průměr činí okolo 400-900 nm. Cvt váčky a autofagosomy mají ale podobnou morfologii (Scott et al, 1997; Baba et al, 1994; Takeshige et al, 1992). I cvt váčky fúzí s vakuolární membránou. Jejich vnější membrána splývá s vakuolární a vnitřní membrána cvt váček je potom obklopena vakuolárním lumen. Takto vzniklá struktura uvnitř vakuolárního lumen obklopená jednovrstevnou membránou se nazývá cvt tělísko, které je obdobou AB, ale je menší. Jedná se o konečnou strukturu, která přináší cvt komplex do vakuoly (Baba et al, 1997).

Jelikož je Cvt dráha a import prApe1 selektivní proces, dochází k interakci mezi prApe1 a nákladovým receptorem Atg19 (Cvt19) díky tzv. coiled-coil (šroubovitě vinuté) struktuře. C terminální oblast tohoto proteinu je potřebná pro přijímání prApe1 komplexu do PAS. Jinak se tato oblast nazývá Ams1-vazebná doména (ABDs), jelikož je zodpovědná za vazbu prekursoru α -manosidasy a její transport do vakuoly. Dalším proteinem, který má významnou roli ve výběru nákladu v selektivní autofagii je Atg11 (Cvt9).

Oligoméry

prekursoru Ape1 se sbalí do vyšších struktur, vznikne Ape1 komplex, který se váže ke komplexu Atg19-Ams1 viz obr. 4. Ape1 komplex se může vázat pouze na Atg19, nezávisle na rozpoznání Ams1 proteinem Atg19. Protein Atg11 rozpoznává domény



Obrázek 4 Model pro selektivní rozpoznání nákladu pro Cvt váčky, popis v textu (Shintani et al, 2002).

váček. Nakonec je komplex inkorporován do cvt váček přes interakci s Atg8 (Shintani et al, 2002; Watanabe et al, 2010). Atg8 tvoří formaci s fosfatidyletanolaminem (PE), která je důležitá jak pro autofagii, tak i cvt dráhu (Ichimura et al, 2000). Přímou úlohu v Cvt dráze má i protein Atg9, který umožňuje tvorbu oddělovacích váček (Noda et al, 2000). Atg18 je nutný pro oddělení membrán a ukončení tvorby cvt váček (Guan et al, 2001). Dále gen *ATG23* je potřebný pro správnou maturaci prekursoru aminopeptidasy I za optimálních podmínek.

Autofagie probíhá i za nepřítomnosti proteinu Atg23, ale ve snížené míře. To znamená, že maturaci prApe1 ovlivňuje pouze, když je aktivní Cvt dráha. Autofagie není blokována, pouze je snížen její rozsah a efektivnost. Atg23 je umístěn společně s Atg9 na PAS (Meiling-Wesse et al, 2004; Tucker et al, 2003). Atg9 (Cvt7) může sloužit jako „marker“ (značka) specializovaných kompartmentů pro cílenou cestu zprostředkovanou váčkem. Atg9 je integrální membránový protein, není lokalizován na váčcích, které přináší prApe1 do vakuoly (Noda et al, 2000). Atg9 cykluje v Cvt dráze a jiných specifických typech autofagie závisle na aktinovém cytoskeletu (He et al, 2006)

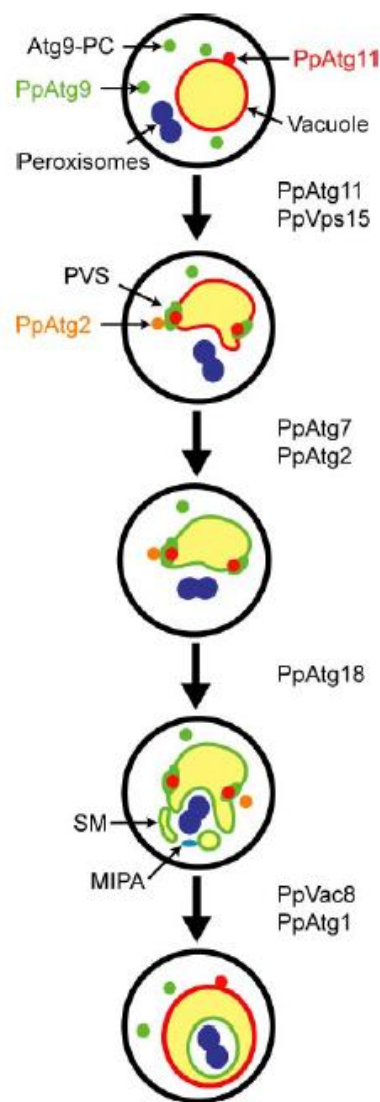
Atg11 (Cvt9 /Gsa9) funguje jako selektivní organizátor pro oddělení cytosolických proteinů a organel do vakuoly pro degradaci. Atg11 nemá funkci pro makroautofagní transport, ale je potřebný pro Cvt dráhu a další typy selektivní autofagie. Ačkoliv Atg11 není zásadní pro prApe1 membránovou vazbu, delece tohoto genu způsobuje destabilizaci interakce mezi prApe1 oligoméry a membránovou strukturou, se kterou se váže. Atg11 je nezbytný pro tvorbu cvt váčků. Tento periferní membránový protein naznačuje místo Atg8 membránového sdružení před vznikem váčků. V tomto místě se dále nachází prApe1 s nákladovým receptorem Atg19 před sbalením do váčků (Kim et al, 2001; Kim et al, 2002).

3.2.2 Pexofagie

Peroxisomy jsou důležité pro přizpůsobení se různým podmínkám dostupnosti živin. Ke zpracování určitých živin jsou potřebné peroxisomální enzymy. Proto za určitých růstových podmínek dochází k peroxisomální proliferaci a za jiných podmínek (změní se zdroj uhlíku) jsou nadbytečné peroxisomy degradovány selektivní autofagní cestou nazývanou pexofagie (Sakai et al, 2006, review). Pexofagie se liší u metylotrofních kvasinek a *Saccharomyces cerevisiae* (Motley et al, 2012). U metylotrofních kvasinek dochází k obrovské peroxisomální proliferaci při růstu na metanolovém médiu, při přechodu na glukózové nebo etanolové médium dochází k mohutné degradaci přebytečných peroxisomů. Pexofagii dělíme na dva různé procesy makropexofagii a mikropexofagii. Během makropexofagie jsou peroxisomy selektivně odděleny jeden po druhém dvojitou izolační membránovou strukturou nazývanou pexofagosom (Ppg). Ppg fúzuje s vakuolární membránou a obsah je degradován vakuolárními enzymy. Během mikropexofagie vakuoly tvoří výčnělky a přepážky, které oddělují shluky peroxisomů (viz obr. 5). S tímto dějem se zároveň na peroxisomálním povrchu tvoří mikroperoxisomální membránový aparát (MIPA), který dokončuje oddělení peroxisomů od cytosolu (Sakai et al, 2006, review).

MIPA obsahující Atg8 se tvoří blízko výčnělků oddělující membrány vakuoly. MIPA je nápomocný při fúzi oddělujících membrán, protože inkorporuje peroxisomy do vakuoly při degradaci. Během etanolem indukované makropexofagie, jednotlivé peroxisomy jsou selektivně inkorporovány do pexofagosomů (Ppg), jejichž membrána obsahuje také Atg8. Pexofagosomy chybí v buňkách postrádajících Atg9. Atg9 je zásadní pro tvorbu oddělující membrány, která vzniká z vakuoly a sbaluje MIPA během mikropexofagie a pexofagosom během makropexofagie (Chang et al, 2005).

U *Pichia pastoris* byl objeven speciální protein Atg30, který zprostředkovává výběr peroxisomů během pexofagie. Je vyžadován pro tvorbu pexofagních intermediátů jako jsou mikropexofagní aparát (MIPA) a pexofagosom (Ppg) u makro- i mikropexofagie. Atg30 je umístěn na peroxisomální membráně s autofagními proteiny Atg8 a Atg17. Fosforylaci Atg30 způsobuje Pex3, po fosforylaci Atg30 následuje přijímání tohoto proteinu do peroxisomů. Atg30 je fosforylován na několika zbytcích, představujících minimálně devět fosforylačních míst. Atg30 je významný pro přemístění Atg8 na MIPA během mikropexofagie a na Ppg během makropexofagie. Atg30 interaguje in vivo se dvěma peroxiny, Pex3 a Pex14 (s pouze fosforylační formou u *Pichia pastoris*) a dvěma Atg proteiny, Atg17 a Atg11. Atg30 je polyfosforylován a nebylo ještě určeno, zda jednou či více kinázami (Farre et al, 2008). U *Hansenula polymorpha* řídícím proteinem je Pex14, který svou fosforylací či defosforylací N konce ovlivňuje biogenezi a selektivní degradaci peroxisomů (Bellu et al, 2001). Dalším řídícím proteinem biogeneze peroxisomů je peroxisomální membránový protein Pex3, který má vlastní specifickou dráhu degradace (Bellu et al, 2002).



Obrázek 5 Model mikropexofagie indukovaná glukózou. PpAtg9 je dopravován z periferního kompartmentu Atg9 na PVS sousedící s vakuolou, který obsahuje PpAtg11 a oddělující membrány (SM), které následně obklopují peroxisomy. Fúze oddělujících membrán umožňují začlenění peroxizomů do vakuoly, které se řídí mikropexofagickým specifickým membránovým aparátem (MIPA), který vyžaduje PpVac8 a PpAtg1 (Chang et al, 2005).

Gsa9 je zásadní komponentou pro degradaci peroxisomů stimulovanou glukózou v *P. pastoris*, jedná se o homolog Atg11 (Kim et al, 2001).

Tvorba membrán de novo během pexofagie je regulována dvěma odlišnými fosfatidylinositoly: fosfatidylinositol 3-fosfát (PI3P) a fosfatidylinositol 4-fosfát (PI4P) a závisí na místně specifické přestavbě sterolu proteinu Atg26 (Yamashita et al, 2006).

Mikropexofagie je rozdělena do čtyř fází. Nejprve buňky rostou na metanolu a mají jednu sférickou vakuolu (Fáze 0). Následuje adaptace buněk ke glukóze, vakuola se invaginuje slabě nebo hluboce okolo peroxisomů, buňky vstupují do Fáze 1. Fázi 1 lze dělit na časnou a pozdní. Ve Fázi 2, peroxisomy jsou kompletně obklopené vakuolární membránou, ale peroxisomální membrány jsou stále neporušené, protože SKL signál (peroxisomální cílový signál) není přítomen ve vakuolárním lumen. Ve Fázi 3, peroxisomální membrány jsou narušeny a dochází k úniku do vakuolárního lumen. Pro příjem peroxisomů je nesmírně důležitá aktivita vakuolárních proteáz (Sakai et al, 1998).

U mikropexofagie lze pozorovat speciální membránovou strukturu, která umožňuje fúzi s vakuolární membránou při konečném kroku peroxisomálního oddělení. Tato struktura se připojuje k peroxisomálnímu povrchu. Pro tvorbu a sbalení této membránové struktury je zapotřebí kompletní cyklizační Paz2 modifikační cesta, která umísťuje protein Paz2 na tuto membránovou strukturu. Buňky vstupující do mikropexofagie mají hluboce invaginovanou vakuolu, jejíž membrána fúzuje se zakřivenou membránovou strukturou a dochází k oddělení peroxisomů z cytosolu. Vakuoly mají dědičnou tendenci zabalovat peroxisomy, ale tento cíl může být tlumen peroxisomální proliferací, při níž funguje Paz2 jako negativní regulátor. Paz2 je ubiquitin podobný protein a v jeho modifikační cestě jsou zahrnuty Paz8, Gsa7, Gsa20 (Mukaiyama et al, 2004). Zpracování proteinem Paz8 není nutné k funkci negativního regulátoru, ale k proběhnutí kompletní mikropexofagie. PAZ2 kóduje hydrofilní protein dlouhý 125 AK, který vykazuje velkou sekvenční identitu s Atg8 (*S. cerevisiae*) a LC3 (krysa), oba jsou umístěny na autofagosomální membráně během makroautofagie. PAZ8 kóduje 533 AK dlouhý protein, který vykazuje největší sekvenční identitu s Atg4. Protein Paz2 je zásadní pro mikropexofagii i makropexofagii v *P. pastoris*, reguluje vakuolární morfologii ještě před nástupem mikropexofagie (Mukaiyama et al, 2002).

3.2.3 Mitofagie

Mitofagie je jedním z velice důležitých procesů kvasinek v přírodě. Jelikož kvasinky jsou často vystaveny podmínkám, kdy musí přepnout mezi dvěma metabolismy, respirací a fermentací. Díky tomuto procesu je buňka ochráněna před nadměrnou produkcí ROS ze

starých či poškozených mitochondrií a udržuje tím buněčnou homeostázi. U starších mitochondrií dochází obvykle k poškození, a tím pádem produkují větší množství ROS. Produkce ROS způsobuje mutace mitochondriální DNA a buňky s poškozenou respirační funkcí jsou citlivější k nižšímu pH (Kurihara et al, 2012; Suzuki et al, 2011). Nahromadění ROS je běžné za podmínek nedostatku dusíku i u kmenů s defektní neselektivní autofagií. Zde se jedná, ale o nedostatek aminokyselin k expresi dostatečného množství mitochondriálních respiračních proteinů (Kurihara et al, 2012). Z tohoto důvodu je důležitější neselektivní typ autofagie pro udržení respirační funkce buňky při nedostatku dusíku v prostředí než selektivní typ (mitofagie) (Suzuki et al, 2011).

Mitochondriální poškození tvořené při anaerobním růstu mutantních buněk nesoucí nefunkční FO-F1 ATPázu spouští mitofagii přes proces, který je založen na core autofagního procesu. Selhání autofagního programu v buňkách by mohlo mít za následek, výskyt mitochondriálních patologií na počátku života, stejně jako u starších buněk. Většina mitochondriálních patologií (neurodegenerativní poruchy, myopatie, diabetes, atd.) jsou spojeny s poškozením oxidační fosforylace (Priault et al, 2005).

K zajištění přímému zahájení mitofagie je zapotřebí cytosolická doména proteinu Atg32, který musí být kotven k mitochondriální vnější membráně. Atg32 interaguje s dalším proteinem Atg11, což je zásadní spojení k urychlení degradace mitochondrií. Regulace tohoto děje je na základě fosforylace, aby protein Atg32 putoval do vakuoly, musí být fosforylován. Je možné, že fosforylaci způsobuje přímo či nepřímo kináza Atg1, která interaguje s proteinem Atg11 (Okamoto et al, 2009; Kondo-Okamoto et al, 2012). Dalším specifickým proteinem pro mitofagii je Atg33, který je požadován pro indukci v post-log fázi. Není vyžadován pro další typy autofagie (Kanki et al, 2009).

3.2.4 Retikulofagie

Endoplasmatické retikulum (ER) je jedním z míst, kde se můžou hromadit špatně sbalené proteiny, což vede k stresové reakci ER a aktivaci odpovědi špatně sbalených proteinů tzv. UPR. Tato odpověď vytváří další formu autofagie, ER-fagii, která je požadována pro buněčné přežití při závažném ER stresu. UPR funguje ve spojení s ER-fagií k nastolení rovnováhy mezi syntézou a degradací ER. Toto spojení je součástí homeostatické kontrolní sítě. Jelikož proliferující ER redukuje koncentraci nesbalených proteinů, ochraňuje před agregací a poskytuje více času k správnému sbalení proteinů nebo k degradaci špatně sbalených proteinů, nebylo by výhodné endoplasmatické retikulum degradovat. ER-fagie tedy raději selektivně odděluje části ER se špatně sbalenými proteiny nebo s agregáty do ERA

váček. ER-fagie může fungovat dvojím způsobem, ERA váčky přenášejí a oddělují poškozené části ER nebo části obsahující agregáty proteinů či redukuje zpětně velikost ER po odeznění ER stresu. ERA se liší vlastnostmi i osudem od klasických hladověním indukovaných autofagosome (Bernales et al, 2006; Bernales et al, 2007). ER stres stimuluje tvorbu PAS, autofagosomu (ERA), který je transportován do vakuoly Atg závislým způsobem. Retikulofagie při ER stresu závisí na Atg1 kinázové aktivitě, která je v tomto případě vysoká (Yorimitsu et al, 2006).

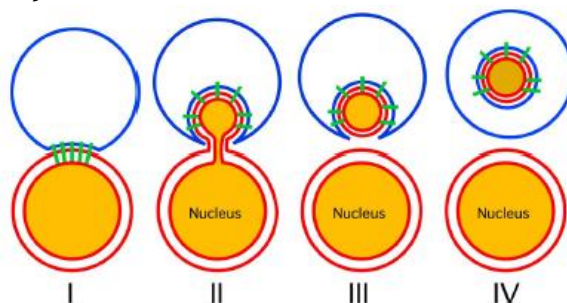
Nejen při ER stresu je endoplasmatické retikulum spojené s autofagií, ale i za podmínek nedostatku živin. ER mohou být selektivně pohlceny autofagosomy nebo se autofagosomy tvoří blízko ER, kde jsou přechodné ER fragmenty stále k dispozici, proto neselektivně, ale velmi účinně pohltní tyto fragmenty (Hamasaki et al, 2005). Skutečnost, že se autofagosomy tvoří blízko ER, potvrzuje domněnku, že ER membrána může být zdrojem membrán pro autofagosomy (Bernales et al, 2006; Bernales et al, 2007). Vychytávání ER autofagosomy je závislé na aktinu. Proteiny golgiho aparátu jsou také přijímány do vakuoly, ale procesem nezávislým na autofagii, přes vakuolární proteinovou cestu. Buňka reguluje množství degradovaných proteinů z golgi a ER tak, aby po skončení období strádání mohla normálně fungovat (Hamasaki et al, 2005).

3.2.5 Nukleofagie

Nukleofagie je selektivní autofagní degradace jádra v kvasinkách, která je řazena jako mikroautofagní proces. Do dnešního dne byly popsány dvě formy nukleofagie, částečná mikroautofagie jádra (PMN) a pozdní nukleofagie (LN).

3.2.5.1 PMN (*Piecemeal microautophagy of the nucleus*)

Část jádra *Saccharomyces cerevisiae* je cílena pro degradaci a recyklaci novou formou selektivní mikroautofagie. Malé části jádra jsou odděleny do invaginací vakuolární membrány a následně degradovány, tento proces je nazýván PMN. Selektivita PMN pro jádro je určena interakcí mezi proteiny Vac8 na vakuolární membráně a Nvj1 v jaderném obalu, což vede k vytvoření NV (nukleo-vakuolární) spojení. Díky tomuto spojení se vytvoří na jaderném obalu puchýřky, které



Obrázek 6 Schématické znázornění čtyř fází PMN. I. fáze tvorba NV spojení, II. fáze vyboulení invaginací jaderného ER do vakuolární membrány, III. fáze odštěpení ER-odvozených váček, IV. fáze vpuštění váčku do vakuolárního lumen a jeho degradace (Krick et al, 2008).

jsou následně odstřiženy z jaderného obalu do vakuoly, tam probíhá jejich degradace viz obr. 6 (Roberts et al, 2003). PMN se uskutečňuje prostřednictvím mnoha morfologicky odlišných meziproduktů. Tento proces vyžaduje vytvoření výstupků jaderné ER do vakuoly (stadium II). Výstupky, naplněné jaderným materiálem v rámci obou membrán ER, pučí v puchýřky (stadium III). A nakonec probíhá fúze puchýřků s vakuolární membránou. Na vakuolární membráně se uvolní PMN váček do vakuoly (stadium IV), kde je degradován v závislosti na přítomnosti vakuolární proteinázy A.

Mezi autofagními složkami potřebnými pro účinnou PMN byli identifikovány všechny složky sdílející selektivní Cvt dráhu a neselektivní makroautofagii. PMN požaduje autofagní funkci Atg18, ale ne jeho funkci v retrográdním vakuolárním transportu. PMN závisí na fosfatidylinositol 3- kinázovém komplexu I, který je požadován pro makro- i mikroautofagii. Atg11 s Atg17 jsou také zásadní pro PMN. Poslední fáze PMN je rozpad PMN váčků ve vakuole. Tato fáze požaduje přítomnost vakuolární proteinázy A a Atg15 a je ovlivněna proteinázou B. Protein Atg15 je lipáza, která je požadována pro intravakuolární lýzi autofagních tělísek a MVB váčků. Fúze vakuolárního prodloužení během PMN není klasická homotypická fúzní událost. Některé složky jsou typické pro homotypickou vakuolární fúzi jako Vtc, Lma1 a Vph1 proteiny. Ale tyto složky nejsou potřebné pro PMN (Krick et al, 2008).

Tvorba jaderných PMN váčků požaduje překrývající se aktivitu Osh1 (oxysterol vazebného proteinu) a dalších členů rodiny Osh a Tsc13. Nvj1 je vazebným receptorem pro Osh1. Osh1 je umístěn na PMN jaderných puchýřcích a může být selektivně cílen k degradaci do vakuolárního lumen závisle na Nvj1 (Kvam & Goldfarb, 2004, Kvam et al, 2005). Nvj1 je integrální membránový protein typu I jaderného obalu a interaguje s Vac8 v cytosolu přes jeho C-terminálních 40-60 aminokyselin. Vac8, který je kotvený do vakuolární membrány myristovými a palmitovými zbytky kyselin. Vac8 také figuruje v autofagii, což naznačují interakce s Atg13. Celková rozloha NV spojení v buňce je limitována *expresí NVJ1*, a nikoliv *expresí VAC8* (Pan et al, 2000). PMN puchýřky a váčky se skládají ze tří soustředných membrán, vakuolární membrány a dvojité membrány jaderného obalu (Kvam et al, 2005).

3.2.5.2 Pozdní nukleofagie (late nucleophagy = LN)

Na rozdíl od PMN, LN nevyžaduje Nvj1 nebo Vac8 ani PI3K komplex I složený z Vps34, Vps15, Atg6 a Atg14 nebo autofagní adaptorový protein Atg11. PMN váčky jsou detekovatelné ve vakuole časně po zhruba třech hodinách od začátku nedostatku dusíku, LN váčky jsou detekovatelné až po 20-24 hodinách. LN je zvláštní proces, který se obvykle

nepotýká s růstem na médiu s nedostatkem dusíku. *ATG* geny byly rozděleny do dvou tříd, podle toho zda ovlivňují morfologii jádra a LN. Třída I včetně *ATG6* a *ATG11* není požadována pro správnou funkci LN. Funkční *ATG* genový produkt z třídy II včetně Atg8, Atg10, Atg3 a Atg4 jsou zásadní pro účinnou LN. Složky komplexů VTC a EGO nejsou požadovány pro LN během autofagie indukované nedostatkem dusíku. LN je časově i prostorově oddělená od PMN. Všechny čtyři složky Atg8-fosfatidylethanolaminu (PE) konjugčního systému (Atg3, Atg4, Atg7, Atg8) jsou zásadní pro účinek LN. Dvě složky Atg9 cyklizačního systému, jmenovitě Atg11 a Atg27, jsou postradatelné pro LN, zatímco Atg2, Atg18, Atg1 a Atg13 jsou požadovány pro LN. Zatím není známo, jak se náklad dostává do vakuoly v LN. Je možné, že adresáty můžou být speciální jaderné složky jako jsou histony, jadérko, komplex jaderných pórů (Mijaljica et al, 2012).

4 Funkce autofagie

Autofagie je velice důležitý děj pro přežití buňky především v nepříznivých podmínkách, proto musí být přísně regulována, aby probíhala jen, když je to nutné. Její důležitost tkví v přizpůsobení buněk okolnímu prostředí (Schlumpberger et al, 1997). V savcích buňkách má autofagie významné místo z hlediska její funkce, účastní se buněčné diferenciace a vývoje, prodloužení životnosti buněk, programované buněčné smrti typu II, prezentace antigenu, potlačení/podpory vzniku nádoru, pohlcuje viry nebo bakterie. Z čehož vyplývá, že jakákoliv porucha této dráhy může způsobit řadu onemocnění jako je rakovina, poškození svalů, neurodegenerace (Shintani & Klionsky, 2004). U kvasinek zvyšuje výkonnost kvašení, udržuje stálé vnitřní prostředí a zajišťuje přísun nezbytných živin a molekul pro život za nepříznivých podmínek (Piggott et al, 2011; Wu & Tu, 2011).

Na regulaci se podílí mnoho systémů, nejznámější je TOR signalizační dráha spojená s protein kinázou A, dále regulace probíhá na úrovni posttranslační a transkripční u Atg proteinů.

4.1 Regulace autofagie

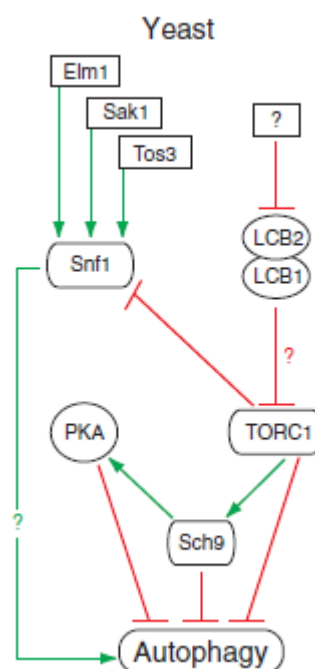
4.1.1 TOR (the target of rapamycin) signalizační dráha

TOR je konzervovaná serin/threonin protein kináza, která reguluje buněčný růst, progresi buněčného cyklu, dopravu živin, syntézu proteinů a autofagii. TOR cesta vnímá škálu živin k vyvolání buněčné odpovědi odpovídající výživovým podmínkám. Signalizační cesta, která aktivuje TOR, vede k inhibici autofagie a naopak pokud signalizace tlumí TOR,

pomáhá to stimulovat autofagii (Pattingre et al, 2008, review; Wullschleger et al, 2006, review; Hardwick et al, 1999; Crespo et al, 2002). Rapamycin indukuje vakuolární proteázy (Pep4, Cps1, Lap3, Lap4, Prb1) a Atg1, serin/threonin kinázu požadovanou pro autofagii (Hardwick et al, 1999). TOR je ústředním hráčem v cestě signalizující nedostatek živin autofagii. Negativně reguluje indukci autofagie tím, že jedná na upstream *ATG* genů. Jednání rapamycinu v indukci autofagie je zprostředkováno proteinem Fkb (Fk506 vazebný protein) (Noda & Ohsumi, 1998). Existují dva odlišné TOR komplexy. TOR komplex 1 (TORC1) obsahuje proteiny Tor1 nebo Tor2 a Kog1 s Lst8. TORC2 obsahuje proteiny Tor2, Avo1, Avo2, Avo3 a Lst8. Na TORC1 působí rapamycin, ale TORC2 není citlivý k působení rapamycinu. TORC1 sdílí TOR signalizaci k zacílení translačního procesu a transkripčního aparátu. TORC1 signalizuje tyto cíle přes Sit4 fosfatázu a Gln3 a Rtg1/3 transkripční faktory. TORC2 řídí signalizaci, která ovlivňuje aktinový cytoskelet přes efektorovou cestu zahrnující Rom2, Rho1, Pkc1 a Pkc1 řízený MAP kinázovou kaskádou. Dva odlišné komplexy zajišťují diverzitu TOR signalizace. TORC1 a TORC2 jsou konzervované od kvasinky po člověka. Kog1, Avo1, Avo3 a Lst8 jsou esenciální proteiny, které mají pozitivní úlohu v TOR signalizaci (Loewith et al, 2002; Wedaman et al, 2003).

4.1.1.1 TOR komplex 1

TORC1 fosforylační aktivita je regulována dostupností živin a tlumena škodlivými vlivy. Nedostatek dusíku či uhlíku způsobuje zánik fosforylačních míst na TORC1. Toto ovlivňuje i efektorovou protein kinázu Sch9 (ACG kináza), která je aktivována fosforylací TORC1 (vztah mezi složkami je naznačen na obr. 7). Sch9 vhodně reguluje biogenezi ribozomů, iniciaci translace a vstup do G₀ fáze (Urban et al, 2007). Sch9 inhibuje MAP kinázu MPK1. Aktivní MPK1 fosforyluje negativní podjednotku PKA, BCY1. Tedy TORC1 aktivuje PKA přes fosforylovanou efektorovou molekulu Sch9, tím zabránuje aktivaci BCY1 přes MPK1 (Soultard et al, 2010). Autofagie je indukovaná v buňkách, když PKA a Sch9 jsou současně inaktivovány. PKA-Sch9 zprostředkovaná autofagie závisí na s autofagií spojených kinázových komplexech 1, které jsou zásadní



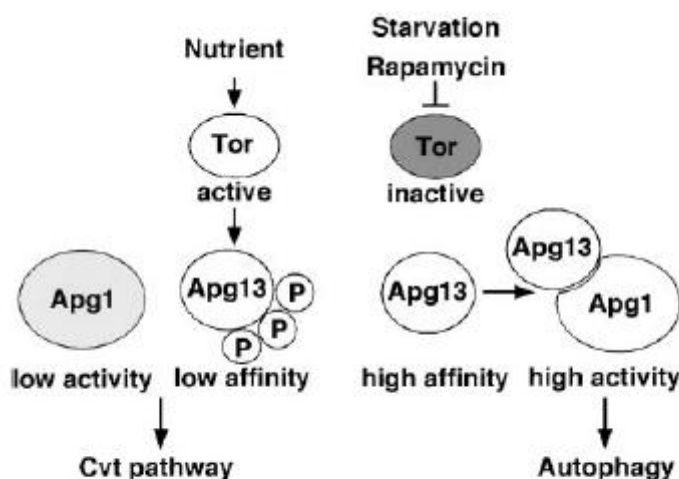
Obrázek 7 Složky TOR signalizační cesty regulující autofagii u kvasinek. Zelené šipky vedou od složek, jenž indukují autofagii, červené vedou od složek, jenž inhibují autofagii (Chen & Klionsky, 2011, review).

pro TORC1 regulovanou autofagii, transkripčních faktorech Msn2/4 a Rim15 kináze. PKA-Sch9 regulace autofagie požaduje kinázovou aktivitu Atg1-Atg13-Atg17 komplexu, podobně jako v strádání či rapamycinem indukované autofagii (Yorimitsu et al, 2007). PKA přímo fosforyluje Atg13, což je regulátor Atg1 kinázové aktivity. Tato fosforylace reguluje umístění Atg13 na preautofagosomální strukturu, což je místo odkud jsou autofagii dopravovány intermediáty do vakuoly. Atg1/Atg13 kinázový komplex je tedy klíčovým místem signální integrace v této degradativní cestě (Budovskaya et al, 2004; Stephan et al, 2009).

EGO (exit from rapamycin – induced growth arrest) komplex, v konjugaci s TOR, konkrétně funguje v rapamycinem citlivé TORC1 signalizační síti, která pozitivně reguluje mikroautofagii. Tedy je protiváhou k masivnímu membránovému vtoku na vakuolární membránu, rapamycinem indukované makroautofagií. Tento děj je důležitý pro obnovení růstu po následném působení rapamycinu. EGO komplex je vakuolární, s membránou asociovaný proteinový komplex, obsahuje Ego1, Gtr2 a Ego3. Gtr2 může fungovat jako malá GTPáza, která se stává významnou pro růst za podmínek poškozené TORC1 aktivity. EGO komplex jedná downstream a nebo paralelně k TORC1 a k řízení mikroautofagie (Dubouloz et al, 2005).

4.1.2 Regulace přes Atg1 komplex

Atg1 je jedna z klíčových složek, které jsou zahrnuty v regulaci ovlivněné TOR signalizační drahou. Atg1 je velice podobný serin/threonin kináze, je potřebný k dopravě materiálu z cytoplazmy do vakuoly. Fosforylace cílového proteinu pomocí Atg1 je zásadní pro autofágii proces (Straub et al, 1997). Protein-kinázová aktivita Atg1 se zvyšuje působením



rapamycinu nebo výživovým strádáním viz obr. 8. Když je Atg13 hyperfosforylovaný Tor závislým

způsobem, snižuje se jeho afinita k Atg1. Atg1-Atg13 spojení je vyžadováno pro autofagii, ale ne pro Cvt pathway. Atg1 komplex, proto hraje důležitou roli v přepnutí mezi dvěma vesikulárními transportními systémy v závislosti na dostupnosti zdroje živin. Zvýšená aktivita

Obrázek 8 Přepnutí mezi Cvt drahou a autofagií pomocí regulace zprostředkované TOR signalizační drahou. Apg1 = Atg1, Apg13 = Atg13 (Kamada et al, 2000).

Atg1 je nutná pro autofagii. Přesto i normální úroveň Atg1 aktivity je potřebná pro Cvt dráhu. Při inhibici Tor jsou zapotřebí k aktivaci Atg1 proteiny Atg13 a Atg17 a Cvt9 (Atg11), s nimiž tvoří komplex (Kamada et al, 2000).

Výživové prostředí je zásadní v určení buněčného chování. Intracelulární, degradativní proces autofagie je úzce regulována intracelulární a extracelulární úrovní živin. Několik klíčových intracelulárních regulátorů, mnoho z nich jsou protein kinázy, hrají úlohu v regulaci autofagie, včetně TOR, PKA, Sch9. Přes Atg1 fungují další regulátoři autofagie, Pho85 je cyklin dependentní kináza fungující jako negativní regulátor. Snf1 je AMP aktivující proteinová kináza, má pozitivně regulující funkci (Wang et al, 2001). Pho85 a jeho cyklické komplexy mají úlohu v regulaci autofagie. Cykliny Pho80, Pcl5 a Pho85 negativně regulují autofagii přes downregulaci protein kinázy Rim15 a transkripčních faktorů Pho4 a Gcn4. Cykliny Clg1, Pcl1 a Pho80 ve spojení s Pho85 pozitivně regulují autofagii. Pomáhají degradovat Sic1, což je negativní regulátor autofagie, který je cílem Rim15. Hlavní úlohou Pho85 v oblasti signalizace z prostředí je vypnutí činnosti, která je potřebná pouze za určitých podmínek stresu. Například, když ubývá anorganického fosfátu, je Pho80-Pho85 komplex inhibován, a tím umožňuje aktivaci Pho4, který podporuje expresi genů zapojených do metabolismu fosfátu a aktivace Rim15, což je klíčový regulátor mnoha aspektů G₀ fáze. V reakci na nedostatek aminokyselin se podstatně sníží koncentrace proteinu Pcl5, což má za následek hypofosforylaci a stabilizaci Gcn4, který aktivuje biosyntézu genů pro aminokyseliny. Oba tyto výživové senzory, komplexy Pho80-Pho85 a Pcl5-Pho85, negativně regulují autofagii. Pho85 zaměřuje regulaci autofagie na dostupnosti fosfátu a aminokyselin. Rim15 integruje signály z negativních i pozitivních drah Pho85 k vlastní kontrole autofagie (Yang et al, 2010).

4.2 Adaptace k prostředí

Významným ukazatelem úrovně živin v buňce je glutamin, který je jedním z hlavních meziproductů v dusíkatém metabolismu. TOR signalizační cesta je schopná vnímat koncentraci glutaminu. Glutamin je tedy jedním z regulátorů TOR signalizační cesty a autofagie, podobně jako další AK. Inhibitor glutamin syntetázy, L-methionin sulfoximin (MSX), specificky vyvolává vyčerpání glutaminu v kvasinkových buňkách. MSX indukovaný glutaminovým nedostatkem způsobuje jadernou lokalizaci a aktivaci TOR inhibujících transkripčních faktorů Gln3, Rtg1 a Rtg3, všech, kteří zprostředkovávají syntézu glutaminu (Crespo et al, 2002). TOR signalizace ovlivňuje také ribosomální syntézu i degradaci zralých ribosomů. Při působení rapamycinu dochází k obrovskému obratu ribosomů v řádech desítek

tisíců za hodinu, buňka tedy musí mít velmi účinný systém, který na místě degraduje její ribosomy. Cytoplasmatická degradace a ribofagie jsou možnými mechanismy pro nastavení velikosti translačního procesu plynoucí z náhlých a rychlých změn dostupnosti živin v prostředí (Pestov & Shcherbik, 2012).

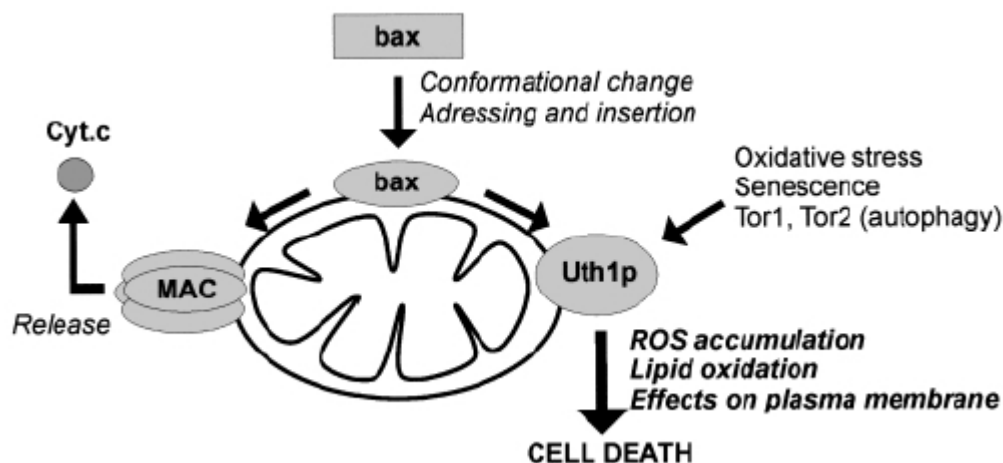
Autofagie může být vyvolána i při malé změně v metabolickém či výživovém stavu, například při přechodu z bohatého média na minimální aniž by v něm byl nedostatek dusíku. Tato nová forma autofagie byla nazvána autofagie indukovaná bez nedostatku dusíku (NNS = non-nitrogen-starvation – induced autophagy). Pro regulaci NNS-indukované autofagie je požadován komplex Iml1, Npr2 a Npr3, tento komplex může regulovat tvorbu autofagosomu. NNS-indukovaná autofagie je požadována pro udržení stálého vnitřního prostředí buňky v odpovědi ke změnám ve složení média a buněčného metabolického stavu (Wu & Tu, 2011). Tento typ autofagie je i patrný u kvasinek v časných fázích kvašení vína. Zde je autofagie také spuštěna jinými formami stresu, než je nedostatek dusíku či AK. Za pomoci recyklace buněčných složek se zvyšuje výkon kvašení. Manipulace s autofagií, pexofagií či ribofagií, modifikací ubiquitin závislých proteinů a jinými procesy se může zvýšit využitelnost kvasinek v potravinářském průmyslu, ve výrobě biopaliv a enzymů (Piggott et al, 2011).

Autofagie může jednat i v obnově mitochondriální funkce a vnímání koncentrace iontů Na^+ . Za stimulaci odpovídá Hal2 nukleotidáza, která detoxifikuje buňku a je cílem vysoké koncentrace Na^+ (Chen et al, 2013). Makroautofagie je zásadní pro růst v podmínkách nízké hladiny zinku, ale nikoliv selektivní dráhy Cvt, pexofagie a mitofagie. Zinek je esenciální živina, protože je kofaktorem pro mnoho enzymů a transkripčních faktorů. Účelem makroautofagie se zdá být degradace proteinů a organel obsahující zinek k uvolnění zinku k dalším potřebám (North et al, 2012).

4.2.1 Programovaná buněčná smrt typu II

Protože je kvasinka jednobuněčný organismus, úloha autofagních tělísek má fagocytický význam během buněčné smrti (Yamaki et al, 2001). Autofagické proteiny mohou za některých podmínek urychlovat populační smrt, autofagie může usnadňovat apoptotickou či nekrotickou formu smrti, což by mohla být její sekundární funkce (Dziedzic & Caplan, 2012). V některých případech může být autofagie představena jako kontrolor kvality nebo konečná buněčná reakce spouštěná, když jsou buňky zahlceny poškozenými mitochondriemi (Priault et al, 2005). Protein Bax je schopný aktivovat smrtelnou dráhu související s autofagií v kvasinkách, která vykazuje typické znaky apoptózy. Gen *UTH1* je potřebný pro funkci proteinu Bax v kvasinkách a také pro rapamycinem indukovanou autofagii, která má

podporující účinek na vyvolání buněčné smrti. Uth1 je první identifikovaný protein, který je požadován pro vnímání rapamycinu v respiračních podmínkách, což naznačuje zvláštní funkci v autofagii mitochondrií (Camougrand et al, 2003). Exprese proteinu Bax indukuje buněčnou smrt kvasinek dvojím způsobem (obr. 9). Jeden způsob závisí na Uth1 a vede k cytochrom c nezávislé autofagní buněčné smrti. A druhý odpovídá apoptóze podobné buněčné smrti, zahrnuje tvorbu MAC (mitochondriální apoptózou indukovaný kanál), uvolnění cytochromu c, oxidativní stres a aktivaci kaspáze podobným proteázám (Camougrand et al, 2004, review).



Obrázek 9 Dva způsoby indukce buněčné smrti u kvasinek vyvolané expresí proteinu Bax. Při působení oxidativního stresu, stárnutí a autofagie se indukuje buněčná smrt přes protein Uth1. Dochází k hromadění ROS molekul, oxidaci lipidů, což ovlivňuje plazmatickou membránu. Při druhém způsobu indukce se tvoří MAC, což vede k uvolnění cytochromu c z mitochondrie a vyvolání buněčné smrti (Camougrand et al, 2003).

Další důkaz, že autofagie a buněčná smrt v kvasinkách jsou propojené děje, nedávno přinesl de Castro et al. Buněčnou smrt indukoval propolisem (rostlinný produkt z pryskyřice). Zjistil, že tato smrt je závislá na kyselosti vakuoly a autofagii. Propolis zvyšuje koncentraci ROS a uvolňuje se cytochrom c z mitochondrií. Úmrtnost také kolísá podle druhu zdroje živin, při respiraci je větší (de Castro et al, 2011).

5 Závěr

Autofagie je v posledních letech ve středu vědecké pozornosti, výzkum je prováděn na celé škále modelových organismů. Přesto zůstává stále mnoho otazníků v této degradační cestě. Existuje mnoho modelů vysvětlujících např. původ membrán v autofagosomech či oddělujících váčcích. Dlouhou řadu let se zjišťovalo, zda-li jsou membrány nově syntetizovány nebo mají původ z jiných organel. V posledních letech je více poznatků spojováno s původem membrán z endoplasmatického retikula, ale není vyloučen i původ mitochondriální. Identifikace a charakteristika nových proteinů (odlišných od Atg proteinů) zapletených v tomto procesu přinese brzy objasnění původu těchto membrán. Dalším velkým otazníkem je rozpletení regulační sítě, identifikování nadřazené regulační molekuly a vysvětlení jak celá regulační kaskáda funguje. V neposlední řadě je nezbytné objasnit mechanismus, kterým buňka reguluje dvě možné odpovědi autofagie, přežití za nepříznivých podmínek nebo spuštění programované buněčné smrti. Porozumění mechanismu a regulaci autofagie stěhuje i skutečnost, že autofagie má širokou škálu působnosti a je propojená s dalšími transportními cestami. Většina poznatků byla získána při vystavení buňky nedostatku živin (hlavně dusíku či nějaké AK). Je tedy málo prozkoumáno, jak autofagie funguje a jak je regulována při spuštění jinými stresovými podmínkami (např. NNS indukovaná autofagie).

V této práci je nastíněno, že adaptace kvasinek k prostředí pomocí autofagie vede k nastolení stálého vnitřního prostředí, k odstranění poškozených organel nebo proteinových agregátů a k přísunu nezbytných látek pro život. Tyto objevy by mohly vést k efektivnějšímu využití kvasinek v potravinářském průmyslu, ve výrobě biopaliv a enzymů díky manipulaci s autofagií.

6 Seznam použité literatury

- Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast – detection of autophagosomes and their characterization. *Journal of Cell Biology* **124**: 903-913
- Baba M, Osumi M, Scott SV, Klionsky DJ, Ohsumi Y (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *Journal of Cell Biology* **139**: 1687-1695
- Bellu AR, Komori M, van der Klei IJ, Kiel J, Veenhuis M (2001) Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 44570-44574
- Bellu AR, Salomons FA, Kiel J, Veenhuis M, van der Klei IJ (2002) Removal of Pex3p is an important initial stage in selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 42875-42880
- Bernales S, McDonald KL, Walter P (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *Plos Biology* **4**: 2311-2324
- Bernales S, Schuck S, Walter P (2007) Selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **3**: 285-287
- Budovskaya YV, Stephan JS, Reggiori F, Klionsky DJ, Herman PK (2004) The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 20663-20671
- Burman C, Ktistakis NT (2010) Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *Febs Letters* **584**: 1302-1312
- Camougrand N, Grelaud-Coq A, Marza E, Priault M, Bessoule JJ, Manon S (2003) The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin. *Molecular Microbiology* **47**: 495-506
- Camougrand N, Kissova I, Velours G, Manon S (2004) Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death. *Fems Yeast Research* **5**: 133-140
- Chen L, Liu LY, Wang MP, Fu JF, Zhang ZJ, Hou J, Bao XM (2013) Hal2p Functions in Bdf1p-Involved Salt Stress Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* **8**

Chang T, Schroder LA, Thomson JM, Klocman AS, Tomasini AJ, Stromhaug PE, Dunn WA (2005) PpATG9 encodes a novel membrane protein that traffics to vacuolar membranes, which sequester peroxisomes during pexophagy in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 4941-4953

Chen YQ, Klionsky DJ (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science* **124**: 161-170

Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 6784-6789

Darsow T, Rieder SE, Emr SD (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *Journal of Cell Biology* **138**: 517-529

de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Barros MH, Goldman MHS, Berretta AA, Goldman GH (2011) Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **10**: 398-411

Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameron E, De Virgilio C (2005) The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular Cell* **19**: 15-26

Dziedzic SA, Caplan AB (2012) Autophagy proteins play cytoprotective and cytotoxic roles in leucine starvation-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **8**: 731-738

Epple UD, Suriapranata I, Eskelinen EL, Thumm M (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of Bacteriology* **183**: 5942-5955

Epple UD, Eskelinen EL, Thumm M (2003) Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae* - Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *Journal of Biological Chemistry* **278**: 7810-7821

Farre JC, Manjithaya R, Mathewson RD, Subramani S (2008) PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Developmental Cell* **14**: 365-376

Guan J, Stromhaug PE, George MD, Habibzadegah-Tari P, Bevan A, Dunn WA, Klionsky DJ (2001) Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 3821-3838

Hamasaki M, Noda T, Baba M, Ohsumi Y (2005) Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic* **6**: 56-65

Harding TM, Hefner-Gravink A, Thumm M, Klionsky DJ (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 17621-17624

Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF, Schreiber SL (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14866-14870

He CC, Song H, Yorimitsu T, Monastyrska I, Yen WL, Legakis JE, Klionsky DJ (2006) Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. *Journal of Cell Biology* **175**: 925-935

Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-492

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *Journal of Cell Biology* **150**: 1507-1513

Kanki T, Wang K, Baba M, Bartholomew CR, Lynch-Day MA, Du Z, Geng JF, Mao K, Yang ZF, Yen WL, Klionsky DJ (2009) A Genomic Screen for Yeast Mutants Defective in Selective Mitochondria Autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 4730-4738

Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y (2008) Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 2039-2050

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **152**: 519-530

Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A, Baba M, Scott SV, Ohsumi Y, Dunn WA, Klionsky DJ (2001) Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *Journal of Cell Biology* **153**: 381-396

Kim J, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 763-773

Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *Journal of Cell Biology* **147**: 435-446

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* **5**: 539-545

Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* **3**: 181-206

Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y, Okamoto K (2012) Autophagy-related Protein 32 Acts as Autophagic Degron and Directly Initiates Mitophagy. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 10631-10638

Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen EL, Millen J, Goldfarb DS, Thumm M (2008) Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 4492-4505

Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang DC (2012) Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 3265-3272

Kvam E, Goldfarb DS (2004) Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* **117**: 4959-4968

Kvam E, Gable K, Dunn TM, Goldfarb DS (2005) Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: A role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 3987-3998

Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *Embo Journal* **17**: 3597-3607

Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* **10**: 457-468

Meiling-Wesse K, Bratsika F, Thumm M (2004) ATG23, a novel gene required for maturation of proaminopeptidase I, but not for autophagy. *Fems Yeast Research* **4**: 459-465

- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2012) A Late Form of Nucleophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* **7**: 16
- Motley AM, Nuttall JM, Hettema EH (2012) Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal* **31**: 2852-2868
- Mukaiyama H, Oku M, Baba M, Samizo T, Hammond AT, Glick BS, Kato N, Sakai Y (2002) Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes to Cells* **7**: 75-90
- Mukaiyama H, Baba M, Osumi M, Aoyagi S, Kato N, Ohsumi Y, Sakai Y (2004) Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 58-70
- Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y (1997) Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry* **121**: 338-344
- Nakatogawa H, Ohbayashi S, Sakoh-Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, Kondo-Kakuta C, Noda NN, Yamamoto H, Ohsumi Y (2012) The Autophagy-related Protein Kinase Atg1 Interacts with the Ubiquitin-like Protein Atg8 via the Atg8 Family Interacting Motif to Facilitate Autophagosome Formation. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 28503-28507
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 3963-3966
- Noda T, Kim J, Huang WP, Baba M, Tokunaga C, Ohsumi Y, Klionsky DJ (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *Journal of Cell Biology* **148**: 465-479
- North M, Steffen J, Loguinov AV, Zimmerman GR, Vulpe CD, Eide DJ (2012) Genome-Wide Functional Profiling Identifies Genes and Processes Important for Zinc-Limited Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos Genetics* **8**
- Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell* **17**: 87-97
- Pan XZ, Roberts P, Chen Y, Kvam E, Shulga N, Huang K, Lemmon S, Goldfarb DS (2000) Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 2445-2457
- Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**: 313-323

- Pestov DG, Shcherbik N (2012) Rapid Cytoplasmic Turnover of Yeast Ribosomes in Response to Rapamycin Inhibition of TOR. *Molecular and Cellular Biology* **32**: 2135-2144
- Piggott N, Cook MA, Tyers M, Measday V (2011) Genome-wide Fitness Profiles Reveal a Requirement for Autophagy During Yeast Fermentation. *G3-Genes Genomes Genetics* **1**: 353-367
- Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP, Martinou JC (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1613-1621
- Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell* **6**: 79-90
- Reggiori F, Monastyrska L, Shintani T, Klionsky DJ (2005) The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 5843-5856
- Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb DS (2003) Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 129-141
- Sakai Y, Koller A, Rangell LK, Keller GA, Subramani S (1998) Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *Journal of Cell Biology* **141**: 625-636
- Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel J (2006) Pexophagy: Autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 1767-1775
- Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**: 1068-1076
- Scott SV, HefnerGravink A, Morano KA, Noda T, Ohsumi Y, Klionsky DJ (1996) Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12304-12308
- Scott SV, Baba M, Ohsumi Y, Klionsky DJ (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *Journal of Cell Biology* **138**: 37-44
- Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, Suzuki K, Ohsumi Y (2009) Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells* **14**: 525-538

Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Developmental Cell* **3**: 825-837

Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science* **306**: 990-995

Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schutz F, Jenö P, Hall MN (2010) The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase A Toward Some But Not All Substrates. *Molecular Biology of the Cell* **21**: 3475-3486

Stephan JS, Yeh YY, Ramachandran V, Deminoff SJ, Herman PK (2009) The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17049-17054

Straub M, Bredschneider M, Thumm M (1997) AUT3, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**: 3875-3883

Suriapranata I, Epple UD, Bernreuther D, Bredschneider M, Sovarasteanu K, Thumm M (2000) The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *Journal of Cell Science* **113**: 4025-4033

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo Journal* **20**: 5971-5981

Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* **12**: 209-218

Suzuki SW, Onodera J, Ohsumi Y (2011) Starvation Induced Cell Death in Autophagy-Defective Yeast Mutants Is Caused by Mitochondria Dysfunction. *Plos One* **6**: 8

Suzuki K (2013) Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death and Differentiation* **20**: 43-48

Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology* **119**: 301-311

Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM, Klionsky DJ (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 2083-2087

- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Letters* **349**: 275-280
- Tucker KA, Reggiori F, Dunn WA, Klionsky DJ (2003) Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 48445-48452
- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* **26**: 663-674
- Wada Y, Nakamura N, Ohsumi Y, Hirata A (1997) Vam3p, a new member of syntaxin related protein, is required for vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* **110**: 1299-1306
- Wang Z, Wilson WA, Fujino MA, Roach PJ (2001) Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 5742-5752
- Watanabe Y, Noda NN, Kumeta H, Suzuki K, Ohsumi Y, Inagaki F (2010) Selective Transport of alpha-Mannosidase by Autophagic Pathways STRUCTURAL BASIS FOR CARGO RECOGNITION BY Atg19 AND Atg34. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 30026-30033
- Wedaman KP, Reinke A, Anderson S, Yates J, McCaffery JM, Powers T (2003) Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 1204-1220
- Wu X, Tu BP (2011) Selective regulation of autophagy by the Iml1-Npr2-Npr3 complex in the absence of nitrogen starvation. *Molecular Biology of the Cell* **22**: 4124-4133
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484
- Xie ZP, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* **9**: 1102-1109
- Yamaki M, Umehara T, Chimura T, Horikoshi M (2001) Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes to Cells* **6**: 1043-1054

- Yamashita SI, Oku M, Wasada Y, Ano Y, Sakai Y (2006) PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy. *Journal of Cell Biology* **173**: 709-717
- Yang ZF, Huang J, Geng JF, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 5094-5104
- Yang ZF, Geng JF, Yen WL, Wang K, Klionsky DJ (2010) Positive or Negative Roles of Different Cyclin-Dependent Kinase Pho85-Cyclin Complexes Orchestrate Induction of Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* **38**: 250-264
- Yorimitsu T, Nair U, Yang ZF, Klionsky DJ (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 30299-30304
- Yorimitsu T, Zaman S, Broach JR, Klionsky DJ (2007) Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 4180-4189